

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA
BIOMEDICA

Tesi di Laurea Triennale (D. M. 509/99)

**EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE
MEDIANTE CAMPI ELETTRICI AD ALTA
FREQUENZA
SU COLTURE DI ASTROCITI MURINI**

Relatore

Prof. Alfredo Ruggeri

Correlatori

Prof. Stefano Vassanelli

Dott. Stefano Girardi

Laureando: Jayasheela Zambon

Anno Accademico 2012/2013

Indice

1	Introduzione	5
	1.1 Le cellule gliali	5
	1.2 I gliomi	7
2	Campi elettromagnetici e tessuti biologici	13
	2.1 Interazione tra campi elettromagnetici e tessuti biologici	13
	2.2 La risonanza quantica molecolare	17
	2.2.1 Vesalius	18
	2.2.2 Rexon-age	18
	2.3 Precedenti sperimentazioni	19
3	Obiettivo della sperimentazione	21
4	Materiali e metodi	23
	4.1 Astrociti murini	23
	4.2 Il dispositivo Rexon-age	24
	4.3 Test svolti	25
	4.4 Elaborazione dei dati	28
5	Risultati	31
	5.1 Risultati dei test svolti	31
6	Conclusioni e commenti	39
	Bibliografia	43

1

Introduzione

1.1 Le cellule gliali

Il tessuto nervoso è uno dei quattro tipi fondamentali di tessuto che compongono il corpo degli animali. Fondamentalmente è composto da due tipi di cellule: i *neuroni*, che sono i responsabili della ricezione e della trasmissione degli impulsi nervosi, e le *cellule gliali*, che, invece, hanno la funzione di supporto strutturale e funzionale.

Le cellule della glia, o nevroglia, che costituiscono il 40% del sistema nervoso centrale, sono cellule di varia forma e funzione che non sono coinvolte direttamente nei processi di trasmissione degli impulsi nervosi, ma che invece offrono un sostegno strutturale ai neuroni, fornendo loro nutrimento, protezione dalle lesioni e svolgendo altri compiti fisiologici come l'isolamento elettrico degli assoni. Le cellule della glia si riproducono frequentemente per mitosi e il loro numero nel cervello supera di nove volte quello dei neuroni[1].

La nevroglia è composta da cellule che si dividono in:

- 1) cellule localizzate nel sistema nervoso centrale (SNC)
- 2) cellule localizzate nel sistema nervoso periferico (SNP)

Nel primo gruppo di cellule si distingue la macroglia, alla quale appartengono gli astrociti e gli oligodendrociti, la microglia e le cellule endoteliali.

Del secondo gruppo di cellule, invece, fanno parte le cellule di Schwann e le cellule satelliti.

Gli **astrociti** costituiscono il tipo più abbondante di cellule della nevroglia e si dividono in astrociti protoplasmatici e astrociti fibrosi, i primi si trovano nella sostanza grigia e sono caratterizzati da espansioni corte e ramificate, i secondi

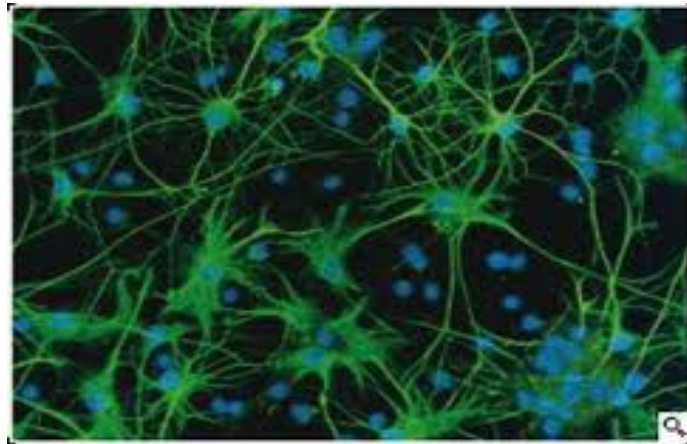


Immagine 1: Astrociti

si trovano nella sostanza bianca e comprendono prolungamenti citoplasmatici lunghi e sottili.

Queste cellule, oltre alla funzione di sostegno meccanico e di rivestimento dei neuroni, hanno un ruolo importante nella regolazione del metabolismo e dell'eccitabilità del neurone. Sono fatti da numerose estroflessioni grazie alle quali contribuiscono al rifornimento di sangue dei neuroni, facendo parte della barriera ematoencefalica insieme alle cellule endoteliali. Inoltre hanno il compito di creare la cicatrice gliale in caso di eventi patologici che portano alla distruzione di tessuto nervoso.

Un altro fondamentale aspetto dell'azione degli astrociti è la regolazione del flusso ionico, in particolare di sodio e di potassio, al fine di adattare la concentrazione ionica extracellulare dei neuroni. Essi inoltre controllano il riassorbimento dei neurotrasmettitori, regolando, ad esempio, la concentrazione del glutammato, che se presente in quantità troppo elevate è causa di morte cellulare.

Gli **oligodendrociti** sono cellule caratterizzate da pochi rami, sottili espansioni citoplasmatiche e piccoli corpi cellulari. Gli oligodendrociti contribuiscono alla regolazione delle concentrazioni ioniche extracellulari e svolgono la funzione essenziale di mielinizzazione dei neuroni del sistema nervoso centrale. A differenza delle cellule di Schwann assistono diversi neuroni contemporaneamente, anziché uno solo.

La **microglia** comprende un gruppo di cellule che si occupano della prima e principale difesa immunitaria attiva nel sistema nervoso centrale. Costituiscono il 20% della popolazione totale di cellule gliali all'interno del cervello.

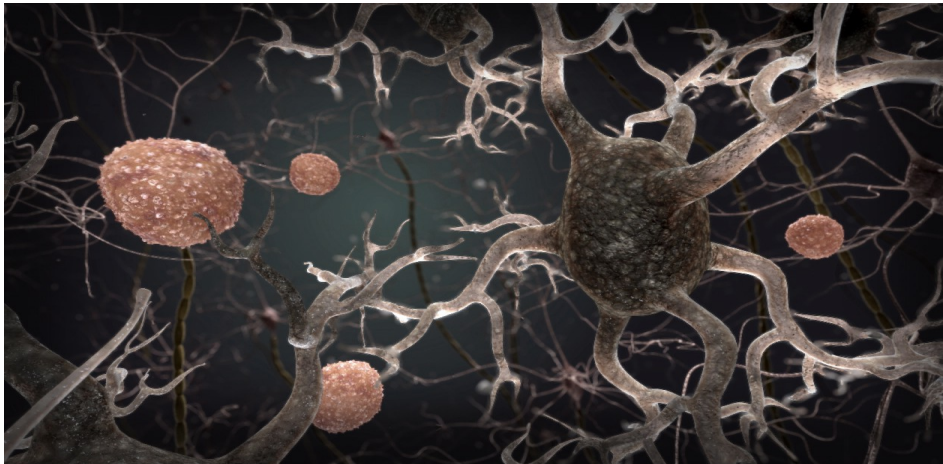


Immagine 2: Microglia

Le **cellule endoteliali**, o endotelioцити, hanno una morfologia cubica/colonnare, sulla loro superficie presentano delle ciglia che hanno il compito di muovere il liquido cerebrospinale nel sistema nervoso centrale. La stessa superficie può essere caratterizzata, in alternativa delle ciglia, da microvilli, che facilitano l'assorbimento del liquido cerebro spinale permettendone il ricambio.

Le **cellule di Schwann** sono cellule la cui principale funzione è di rivestire gli assoni dei neuroni con uno strato di mielina. Inoltre hanno un'attività fagocitaria e ripuliscono dai residui cellulari permettendo la ricrescita dei neuroni del sistema nervoso periferico.

Le **cellule satelliti** si trovano si trovano tra le fibre muscolari e l'endomysio, ovvero la guaina di tessuto connettivo che le ricopre. La presenza di questo tipo di cellule implica la capacità rigenerativa del tessuto.

1.2 I gliomi

Il glioma è un termine generico indicante i tumori del sistema nervoso centrale derivati dalla proliferazione di cellule della nevroglia.

I gliomi sono i tumori più frequentemente osservati nel sistema nervoso centrale, insorgono prevalentemente in soggetti adulti e si localizzano di preferenza negli emisferi cerebrali.

A seconda dei caratteri delle cellule tumorali, che riproducono gli aspetti dei diversi tipi di nevroglia, si distinguono tipi corrispondenti di gliomi.

I tumori cerebrali si distinguono in:

- 1) *tumori primari*, che si sviluppano nel cervello *ex novo*, e raramente metastatizzano;
- 2) *tumori secondari* che interessano il cervello a seguito di metastasi di tumori di altri organi.

I tumori primari si dividono in due grandi tipologie: i tumori gliali (o gliomi) e i tumori non gliali. I primi sono i tumori cerebrali più diffusi: costituiscono circa il 40% dei tumori cerebrali primari.

I tumori secondari più comuni sono i Meningiomi, che hanno origine da cellule delle meningi e prevalentemente sono benigni, e i Medulloblastomi, che sono caratteristici della fossa cranica posteriore.

I gliomi più comuni sono gli:

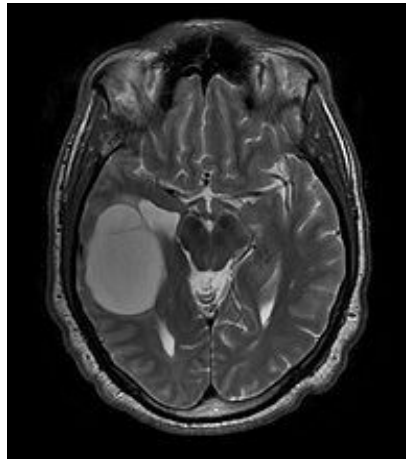
- ◆ astrocitomi
- ◆ oligodendrogliomi
- ◆ ependimomi

Gli **astrocitomi** sono i tumori che originano a partire dagli astrociti e sono i più frequenti. Possono essere circoscritti o diffusi, i primi, meno frequenti, sono poco infiltranti, mentre i secondi tendono ad infiltrare nella materia bianca e sono quindi più complessi da asportare chirurgicamente.

Gli **oligodendrogliomi** rappresentano il 5-15% dei gliomi, sono più frequenti in età pediatrica e tra i cinquanta e i sessanta anni e costituiscono circa il 4% dei tumori del sistema nervoso centrale. Essi hanno un decorso maggiormente benigno, sono meno infiltranti degli astrocitomi e rispondono meglio alle terapie citotossiche. Il grado di malignità si attribuisce in base alla presenza di ipercellularità, attività mitotica e necrosi, tipiche di neoplasie con sopravvivenza media inferiore.

Si possono presentare forme miste, cioè che contengono una componente oligodendrogliale ed una astrocitaria; il grado di aggressività dipende da quale sia la

componente maggioritaria, essendo quella astrocitaria associata ad una maggiore malignità.



*Immagine 3: Immagine RM pesata
in piano orizzontale di
oligodendroglioma*

Gli **ependimomi** sono i gliomi che originano dalle cellule dei ventricoli cerebrali e del canale centrale del midollo spinale. Maggiormente riscontrati nelle prime due decadi di vita, rappresentano il 10% dei tumori cerebrali di infanzia ed adolescenza ed il 2-3% dei tumori del sistema nervoso centrale. Essi sono generalmente a crescita lenta e virano in senso maligno meno frequentemente rispetto agli astrocitomi.

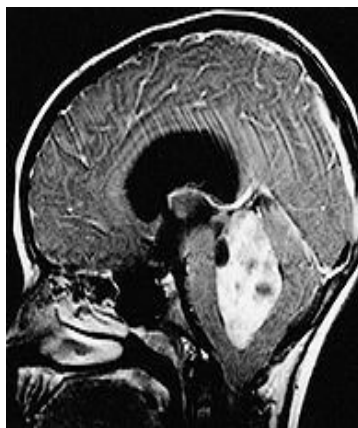


Immagine 4: Lastra radiologica di ependimoma del quarto ventricolo

La prognosi è fortemente legata al grado di tumore diagnosticato.

Dal 1993 il sistema di gradazione più accettato e diffuso per la gradazione di malignità del sistema nervoso centrale è il sistema a quattro livelli proposto dalla World Health Organization (WHO).

Questo sistema si basa su quattro caratteristiche istologiche: atipia nucleare, presenza di mitosi, proliferazione endoteliale e necrosi. In particolare si usa la dicitura “glioma di basso grado” per indicare tumori gliali di grado I e II, mentre si usa “glioma di alto grado” per i tumori gliali di grado III e IV.

In particolare analizzando gli astrocitomi si distinguono i seguenti livelli[2]:

1. Grado I:

- Astrocitoma Pilocitico (o la variante Astrocitoma pilomixoide)

È un tumore benigno a crescita lenta, ben differenziato e circoscritto. Raramente riscontrato in età adulta è più frequente in bambini e giovani di età inferiore ai 20 anni[3]. La prognosi è generalmente favorevole, dipendente essenzialmente dalla possibilità o meno di un'asportazione chirurgica radicale. Le sedi più frequenti in cui si sviluppa sono il lobo temporale ed il cervelletto. Molto spesso è cistico.

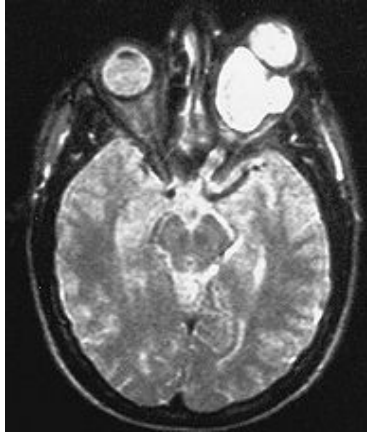


Immagine 5: Immagine RM in piano orizzontale dell'astrocitoma pilocitico retrobulbare del nervo ottico

- **Astrocitoma subependimale a cellule giganti**
E' un tumore a crescita lenta, non infiltrante e che spesso origina dalla parete dei ventricoli. Ha generalmente prognosi favorevole ed è spesso associato alla sclerosi tuberosa. Insorge solitamente nelle prime due decadi di vita.
2. Grado II:
- **Xantocitoma pleomorfo**
E' un tumore raro, circoscritto e localizzato superficialmente nel lobo temporale. E' più frequente nell'infanzia ed in pazienti di giovane età. La sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi arriva all' 80%.
 - **Astrocitoma diffuso[4]**
E' un glioma a crescita lenta, si distingue da quello a grado I per i contorni non nitidi che rendono l'asportazione chirurgica più complessa e difficilmente radicale. Spesso presenta mutazioni nel tempo che lo rendono più aggressivo. La sopravvivenza media è di cinque-sei anni.
3. Grado III:
- **Astrocitoma anaplastico**
E' una neoplasia caratterizzata da una crescita rapida ed un'alta recidività. E'

un tumore infiltrante, e quindi la totale escissione chirurgica è impossibile. Può insorgere come degenerazione maligna di tumori di grado inferiore e tendenzialmente vira a glioblastoma multiforme. Si presenta maggiormente in pazienti tra i cinquanta e i sessanta anni. La sopravvivenza è del 50% a due anni e del 18% a cinque anni dalla diagnosi.

- Gliomatosis cerebri

Identifica un raro tumore del sistema nervoso centrale nel quale cellule neoplastiche gliali infiltrano diffusamente estese porzioni di esso. Il tumore può fare la sua comparsa *de novo* o essere il risultato di propagazione di un glioma inizialmente focalizzato.

4. Grado IV:

- Glioblastoma (con le varianti Glioblastoma a cellule giganti e Gliosarcoma)

Può svilupparsi a partire da astrocitomi di grado inferiore ed è altamente maligno ed infiltrante, con una sopravvivenza media che va dai sei ai dodici mesi. E' caratterizzato da estremo polimorfismo cellulare, necrosi, ed è spesso associato ad una proliferazione vascolare.

Di questo tumore esistono due varianti: il glioblastoma a cellule giganti e il gliosarcoma. Il primo è caratterizzato da cellule molto grandi, con un diametro che arriva anche ai 400 μm , e multinucleate; il secondo presenta una componente astrocitaria ed una mesenchimale. Anche con chirurgia e successive terapie (radiante e chemioterapia) la sopravvivenza per un paziente affetto da glioblastoma è bassa, in genere inferiore a due anni.

2

Campi elettromagnetici e tessuti biologici

2.1 Interazione tra campi elettromagnetici e tessuti biologici

Il campo elettromagnetico è costituito dalla combinazione del campo elettrico e del campo magnetico, è generato localmente da qualunque distribuzione di carica elettrica variabile nel tempo e si propaga sotto forma di onde elettromagnetiche.

Il corpo umano è costantemente immerso nei campi elettromagnetici[5] per tutti quei fenomeni naturali riconducibili alla natura elettromagnetica, primo su tutti l'irraggiamento solare. Proprio per approfondire il legame tra esposizione a campi elettromagnetici e salute umana sono stati avviati studi epidemiologici specifici. L'interazione dei campi elettromagnetici con la materia, ed in particolare con i tessuti biologici, è un tema complesso e interdisciplinare.

Per prima cosa bisogna sottolineare il fatto che in generale i tessuti biologici non mostrano proprietà magnetiche, e quindi non sono caratterizzati da effetti magnetici. La radiazione elettromagnetica è la forma di energia associata all'interazione elettromagnetica, ed è responsabile della propagazione nello spazio e nel tempo del campo elettromagnetico sotto forma di onde elettromagnetiche.

L'interazione elettromagnetica ha un ruolo principale sia nei processi “elementari”, come i potenziali d'azione delle membrane cellulari, che in quelli estremamente complessi come le capacità cognitive. Questo meccanismo permette infatti la propagazione di impulsi elettrici nelle cellule ed è quindi funzionale alle cellule nervose, alle fibre muscolari e cardiache.

E' quindi importante studiare l'interazione tra campi elettromagnetici e tessuti biologici per comprenderne i meccanismi ed i possibili effetti biologici e sanitari.

Tali effetti dipendono essenzialmente dall'*intensità* dei campi applicati ed in modo rilevante anche dalla loro *frequenza*.

Ad alta intensità le interazioni sono distruttive, ma anche la frequenza riveste una notevole importanza dal punto di vista dei possibili danni biologici.

E' necessario distinguere le radiazioni ionizzanti da quelle che non lo sono.

Le prime hanno una frequenza molto elevata, sopra il limite dell'ultravioletto, la lunghezza d'onda associata è dell'ordine delle dimensioni molecolari ed atomiche, implicando, così, un'interazione con gli elettroni dei legami che può causare la ionizzazione degli atomi, con conseguenti danni alle strutture del DNA.

Le radiazioni non ionizzanti, invece, hanno frequenze molto minori ed i loro effetti sono molteplici ed attualmente oggetto di studio. Si distinguono in base alla frequenza in:

- 1) Frequenze estremamente basse (ELF – Extremely Low Frequency), con frequenza minore di 300 Hz;
- 2) Radiofrequenze (RF – Radio Frequency), comprese tra i 300 KHz e i 300 GHz.

In base alla frequenza, poi, i campi elettromagnetici non ionizzanti possono essere distinti in:

- *Campi elettrici e magnetici statici* (0 Hz);
- *Campi elettrici e magnetici a bassa e media frequenza* (fino a 3 Mhz);
- *Campi elettrici e magnetici ad alta frequenza* (fino a 3 Ghz);
- *Campi elettrici e magnetici ad altissima frequenza* (fino a 300 Ghz).

Per quel che riguarda i campi statici, gli studi mirati ad analizzare gli effetti sui tessuti biologici hanno tendenzialmente portato alla conclusione che tali campi non siano in genere rilevanti per basse intensità.

Un maggiore interesse hanno invece riscontrato le sperimentazioni su campi variabili, le cui interazioni con sistemi biologici sono più evidenti[6].

Tali interazioni possono essere distinte in interazioni di tipo termico e non termico.

La prima tipologia è legata alla trasformazione dell'energia elettromagnetica in calore, con conseguente innalzamento della temperatura delle cellule sottoposte al campo. Nel momento dell'interazione l'energia può essere trasmessa agli ioni, certamente presenti nelle cellule in quanto ricche di soluzioni saline. Questi ultimi vengono sollecitati a muoversi con velocità più elevate e conseguente aumento della temperatura. Un altro schema di assorbimento energetico riguarda l'interazione in risonanza fra la frequenza del campo eccitante ed una delle frequenze tipiche di oscillazione delle molecole sottoposte al campo. Questo processo consente una cessione selettiva di energia elettromagnetica mirata ad alcuni tipi di strutture cellulari preservandone altri, con effetti termici limitati. Di questa seconda tipologia non sono ancora del tutto chiari i meccanismi quantistici che ne stanno alla base.

Gli effetti termici sono stati per molto tempo l'unica tipologia considerata; recentemente, molti studi hanno iniziato ad indagare le interazioni a livello cellulare con limitato scambio termodinamico di energia. Queste interazioni rivestono interesse nel campo biomedico in quanto gli eventuali utilizzi associati risultano poco invasivi per i tessuti.

Quindi sono numerosi gli studi sperimentali in vitro volti ad analizzare gli effetti di campi elettromagnetici, a diverse frequenze, su vari parametri biologici. In questi studi vengono monitorate le variazioni della cinetica della proliferazione cellulare, nell'attività enzimatica, nei flussi ionici intermembrana e nel corredo cromosomico.

Per quanto riguarda i campi variabili a basse frequenze molti studi hanno verificato che tali campi hanno un'influenza sulla proliferazione cellulare. E' significativo come gli effetti biologici dei campi elettromagnetici a bassa frequenza siano attualmente impiegati come terapia nella stimolazione della ricrescita ossea in alcune tipologie di fratture per la rigenerazione del tessuto osseo, con l'obiettivo di

aumentare l'osteogenesi.

Per quanto riguarda i campi elettromagnetici ad alta frequenza gli studi svolti sono associati a microonde (tra i 30 e i 300 GHz), frequenze utilizzate per la telefonia mobile (tra i 300 MHz e i 3 GHz) e frequenze in uso per applicazioni industriali, vista la notevole diffusione di tali campi.

In alcune sperimentazioni in vitro sono state riscontrate alterazioni delle proprietà dei canali ionici di membrana e variazioni di flussi ionici in corrispondenza di alcuni SAR (tasso di assorbimento specifico)[7]. Altri studi hanno rilevato un aumento dell'attività dell'enzima ODC (ornitina decarbossilasi) in colture di fibroblasti di topo[8].

I risultati di test, che consistevano nel sottoporre a campi elettromagnetici cellule di mammifero, hanno evidenziato che, a seconda del tipo di cellule e delle condizioni di esposizione, la proliferazione risultava incrementata o diminuita. In particolare si è verificato che attraverso sperimentazioni su cellule di astrocitoma umano con un campo ad alte frequenze, la proliferazione diminuiva, a seguito di un'interazione non esclusivamente termica[9]. Altri studi hanno rilevato un'inibizione della proliferazione di cellule tumorali sottoposte a campi elettrici alternati a medie frequenze[10]. L'effetto inibitorio di crescita è stato riscontrato sul tasso di crescita di cellule tumorali sia umane che di roditori. Questi campi agiscono in due modi: arrestano la proliferazione cellulare e distruggono le cellule durante la fase di divisione mitotica.

Da questi risultati si intuisce l'applicabilità potenziale dei campi elettromagnetici per esercitare un'applicazione terapeutica per tumori maligni.

Oltre allo studio dei campi elettromagnetici sui tessuti biologici a livello cellulare, si sono sviluppati, in biologia e medicina, vari filoni di ricerca collegati all'esposizione a campi elettromagnetici e riguardanti, ad esempio, lo sviluppo embrionale e fetale e gli effetti sul sistema nervoso centrale e sul sistema immunitario.

Grande importanza riveste infine lo studio di un possibile legame tra insorgenza di tumori e campi elettromagnetici, sia attraverso meccanismi diretti di tipo genotossico, sia per processi diretti di tipo epigenetico. Non è tutt'ora confermato che

vi sia una diretta relazione tra l'esposizione a campi elettromagnetici, sia a bassa che ad alta frequenza, e lo sviluppo di patologie neoplastiche.

Continui studi vengono effettuati sui diversi campi elettromagnetici, ed è quindi un campo della ricerca ancora in evoluzione.

2.2 La risonanza quantica molecolare

Quando si fornisce qualsiasi forma di energia ad un sistema, spesso gran parte di essa viene dissipata in calore, cioè in energia cinetica molecolare.

Questo accade perchè l'energia viene trasmessa da una sorgente ad un utilizzatore per pacchetti o quanti di energia, il cui valore spesso eccede quello necessario al sistema per compiere una specifica attività, producendo così calore.

Il valore di energia trasportata da questi quanti dipende dalla frequenza che li ha prodotti.

Quando questi quanti di energia colpiscono il ricevente, in questo caso il tessuto umano, in esso si produce un'azione che può essere di due diversi tipi[11]:

- 1) se il valore dell'energia del quanto è diversa dall'energia di legame della molecola colpita, si ha solo un aumento dell'energia cinetica della molecola senza rottura del loro legame, il che comporta un aumento della temperatura;
- 2) se il valore dell'energia del quanto è uguale all'energia di legame della molecola allora tutta l'energia del quanto viene utilizzata per rompere il suddetto legame, senza aumentare l'energia cinetica e quindi senza aumentare la temperatura.

Si è sfruttando il secondo tipo di meccanismo indotto dall'energia in un corpo umano per progettare della strumentazione biomedica dotata di prestazioni migliori di quella usata fino ad ora.

Un esempio è il *bisturi a Risonanza Quantica Molecolare*. Questo dispositivo, infatti, usa campi elettrici in alta frequenza con onde combinate in modo particolare (sistema CSS).

L'onda fondamentale a 4 MHz e le successive onde a 8, 12, 16 MHz con ampiezza decrescente e aumento della frequenza creano quanti energetici di valore tale da

rompere i legami molecolari senza comportare l'aumento di energia cinetica degli atomi e delle molecole colpite, e quindi senza aumentare la temperatura.

2.2.1 Vesalius

Vesalius è un Bisturi a Risonanza Molecolare, cioè rappresenta un'evoluzione rispetto agli elettrobisturi/radiobisturi, basando il suo principio di funzionamento sulla Teoria della Risonanza Quantica Molecolare.

Questo bisturi[12], in confronto a quelli tradizionali, utilizza uno spettro particolare di frequenze brevettato per qualsiasi funzione si utilizzi e per entrambe le uscite (monopolare e bipolare). Si deve sottolineare che il taglio, molto preciso e delicato, non è provocato dal riscaldamento del tessuto, ma dalla rottura diretta dei legami molecolari: avviene quindi senza produzione di calore. Il risultato di questo fatto è che la temperatura del tessuto, nell'istante del taglio, non supera mai i 45-50 °C, e quindi non viene mai prodotto tessuto necrotico. Durante la coagulazione vengono generate anche delle frequenze fuori risonanza in modo da innalzare leggermente la temperatura a circa 63-65 °C; a questa temperatura si attiva la denaturazione proteica del fibrinogeno che si trasforma in fibrina, ottenendo quindi la coagulazione del sangue senza danneggiamento del vaso.

Il bisturi a Risonanza Molecolare è unico al mondo ed è brevettato dalla Telea Electronic Engineering s.r.l.. Offre numerosi vantaggi: notevole riduzione del tessuto cicatriziale, grandissimi vantaggi in tecnologie particolarmente delicate, dà un risultato estetico eccezionale, analisi istologiche precise, riduzione nel dolore post operatorio ed un recupero veloce e permette tempi operativi rapidi[13].

Dal punto di vista clinico significa che la necrosi secondaria è inesistente e la guarigione sarà per prima intenzione senza edema e ridotto dolore post operatorio. Anche la coagulazione avviene in modo atraumatico, senza creare necrosi del tessuto circostante.

2.2.2 Raxon-age

Il Raxon-age rappresenta un'applicazione innovativa e diversa, rispetto al bisturi Vesalius, della Risonanza Quantica Molecolare, avendo come scopo la rigenerazione

tessutale. Questo dispositivo, attraverso l'utilizzo di correnti ad alte frequenze e piccole intensità, sostituisce l'effetto di incisione ottenuto dal Vesalius con una stimolazione che migliora la struttura e la funzionalità dei tessuti, in particolare la pelle, i muscoli e i legamenti.

Il Rexion-age usa uno spettro di frequenze tale da ridurre al minimo la perdita di energia sotto forma di calore per raggiungere la risonanza con i legami molecolari che permette invece un'interazione a livello cellulare. Quindi questa applicazione permette di mantenere la temperatura del tessuto relativamente bassa, tale che nei tessuti trattati non superi mai i 42-43 °C.

Il Rexion-age oggi è utilizzato per terapie estetiche di ringiovanimento della pelle e per trattamenti antalgici con buoni risultati curativi del dolore dovuto ad infiammazioni, strappi muscolari e dolori muscolari. Ha effetti positivi anche nel trattamento di acne, cellulite e nella circolazione linfatica.

Dall'osservazione della sua azione rigenerativa a livello cellulare sorge l'ipotesi che la stimolazione con risonanza molecolare sia applicabile anche nel trattamento di cellule tumorali[14].

Quindi il modello dell'apparecchio reso disponibile dalla Telea Electronic Engeneering s.r.l. verrà utilizzato per la stimolazione degli astrociti murini, con modifiche appropriate per permettere la stimolazione di colture cellulari allestite in delle petri.

2.3 Precedenti sperimentazioni

Il progetto generale ha come scopo la verifica dell'effetto della stimolazione attraverso campi elettromagnetici di cellule gliali. La stimolazione è eseguita con lo strumento Rexion-age.

Sono stati svolti alcuni test preliminari dell'applicazione del trattamento su cellule di astrocitoma umano, per verificare se le micro correnti fossero dannose per le cellule e se causassero un aumento di temperatura nel terreno di coltura tale da poter influire sulla loro sopravvivenza. Da tali test si è potuto concludere che il trattamento con il Rexion-age fino ad una potenza nominale di 70 (corrispondente ad una potenza efficace di 17,88 W) non influisce sulla vitalità cellulare.

Inoltre questi test indicano che l'applicazione di potenze nominali da 10 (corrispondente ad una potenza efficace di 0,04 W) ad 80 (corrispondente ad una potenza efficace di 25,75 W) causa un incremento di temperatura trascurabile, poiché risulta di molto inferiore all'escursione termica che comunemente le cellule subiscono durante gli esperimenti in un laboratorio a temperatura controllata.

Per sviluppare il progetto generale si è deciso di fare un'analisi separata dell'effetto della stimolazione sulle cellule gliali malate, cioè tumorali, e quelle non affette da tumore, cioè sane.

Le prime sperimentazioni svolte, che sono state quattro, sono state eseguite su cellule tumorali. Il risultato finale, e comune a tutte e quattro le sperimentazioni, è stato positivo, cioè se le cellule tumorali sono stimulate mediante campi elettromagnetici la loro proliferazione decresce.

La sperimentazione che verrà descritta di seguito, invece, riguarda la seconda fase del progetto.

3

Obiettivo della sperimentazione

L'attività svolta si inserisce all'interno di un progetto che ha come fine l'analisi degli effetti del dispositivo Raxon-age su cellule gliali, affette da tumore o sane.

In questo caso particolare si tratta l'analisi su cellule sane.

La tecnologia su cui si basa lo strumento Raxon-age svolge un'intensa e dimostrata attività a livello cellulare, che però non è stata ancora completamente studiata ed i cui effetti potrebbero essere più ampi di quelli per cui è attualmente utilizzata. Da questa considerazione è nata l'ipotesi di una possibile influenza del trattamento sulla proliferazione delle cellule sane.

Il Raxon-age è stato fino ad ora sfruttato per terapie estetiche ed antalgiche; se la sperimentazione confermasse l'ipotesi fatta, il suo utilizzo potrebbe essere in futuro esteso anche al trattamento di tumori cerebrali.

Si vogliono quindi osservare le conseguenze del trattamento sulla proliferazione in vitro di cellule gliali sane, valutandone il tasso di crescita a seguito dell'applicazione del campo elettrico con il particolare spettro di frequenze brevettato da Telea Electronic Engineering s.r.l..

In particolare l'analisi svolta di seguito è eseguita per verificare e quantificare la stabilità o, nel migliore dei casi, l'aumento del tasso di crescita cellulare dovuto all'applicazione di una potenza efficace di circa 2 W.

4

Materiali e metodi

4.1 Astrociti murini

In questa sperimentazione si usano astrociti murini, cioè astrociti appartenenti alla nevroglia di ratti.

Sono chiamati in questo modo per la loro particolare forma stellata.

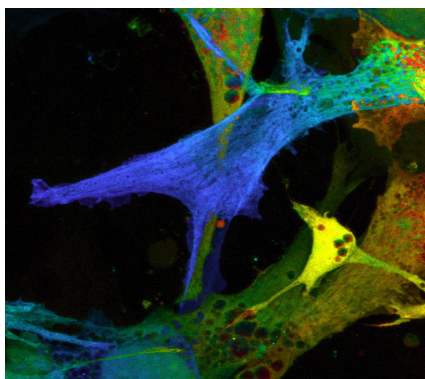


Immagine 6: Astrociti murini

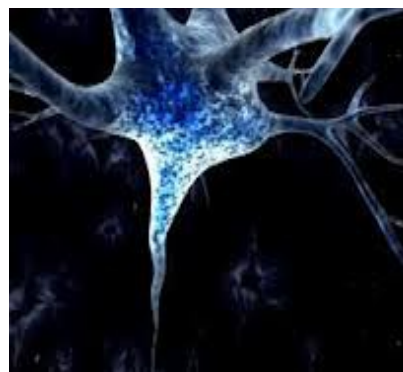


Immagine 7: Immagine tridimensionale di astrocita murino

Il terreno di coltura in cui le cellule sono state disposte per permetterne la sopravvivenza e la crescita è composto da:

- D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, addizionato di L-glutamina (Invitrogen-Gibco))
- FBS 10% (Foetal Bovine Serum, Invitrogen-Gibco)
- Antibiotici (Penicillina 10u/ml, Streptomicina 10 µg/ml)

Il D-MEM è un terreno di coltura liquido con adeguato contenuto di amminoacidi, vitamine, sali e zuccheri. Ad esso si aggiunge siero bovino fetale ricco di proteine plasmatiche, fattori di crescita, ormoni ed altri elementi come transferrina albumina, colesterolo, acidi grassi e glucocorticoidi. Infine gli antibiotici, che sono necessari per evitare la contaminazione da parte di batteri.

4.2 Il dispositivo Raxon-age

Il dispositivo Raxon-age è stato adattato per consentire la stimolazione di colture cellulari in vitro. La modifica effettuata consiste nell'averlo dotato di un primo elettrodo di terra e di un secondo elettrodo di forma cilindrica, appositamente creato per l'inserimento in petri circolari di diametro 35 mm. L'elettrodo permette quindi una stimolazione uniforme del contenuto della petri.



Immagine 8: Dispositivo Raxon-age

Le caratteristiche tecniche del Rexion-age sono le seguenti:

- Tensione di alimentazione: 230 V
- Frequenza d'alimentazione: 50/60 Hz
- Potenza massima assorbita dalla rete: 250 VA
- Potenza massima in uscita: 40 W/1500 Ohm
- Frequenza in uscita: spettro in frequenze da 4 MHz a 64 Mhz
(spettro brevettato)
- Grado di protezione contro l'ingresso di liquidi: IPX0

4.3 Test svolti

La sperimentazione che verrà decritta comprende un certo numero di analisi tra di loro indipendenti. Le analisi che sono state effettuate in un periodo di circa tre mesi consecutivi nel quale si sono acquisite le tecniche per l'esecuzione dell'esperimento.

Per valutare l'effetto della stimolazione su astrociti murini, la tecnica adottata è stata di stimolare le cellule in coltura per un periodo di tempo stabilito in partenza, precisamente una settimana, al fine di calcolarne il tasso di crescita.

Ogni singola sperimentazione è stata effettuata usando delle petri, cioè dei piccoli recipienti rotondi, di diametro 35 mm.

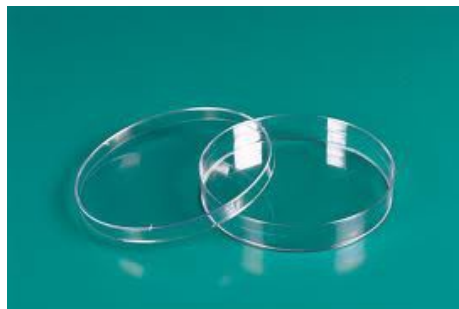


Immagine 9: Petri

Per ogni analisi il numero totale di petri viene diviso in due gruppi uguali. In questo modo, per ogni verifica, un gruppo rappresenta le “stimolate”, cioè le petri a cui viene effettivamente applicato il trattamento, e un gruppo rappresenta i “controlli”, cioè le petri usate come confronto.

Ogni stimolazione, applicata una volta al giorno, ha avuto una durata di dieci minuti ed una potenza nominale impostata a 40, corrispondente in valore efficace ad una tensione di quasi 57 V, una corrente di 34 mA, per una potenza efficace di 2 W.

Le stimolazioni avvengono all'interno di una cappa che precedentemente è stata sterilizzata attraverso raggi ultravioletti, poichè è assolutamente necessario lavorare in sterilità.

La petri va posizionata sopra l'elettrodo adesivo di terra, mentre all'interno della stessa si posiziona l'elettrodo di stimolazione, direttamente a contatto con il terreno di coltura.

Dopo ogni stimolazione, la petri va riposta nell'incubatore, con condizioni ideali per la duplicazione cellulare. L'incubatore mantiene una temperatura di 36,5 °C ed una concentrazione di anidride carbonica del 5%. Le condizioni di tutte le petri vengono mantenute costanti per tutta la durata del trattamento.

Inoltre per ogni stimolazione, una petri dei controlli ed una delle stimulate sono state manipolate sempre insieme, in modo da essere sottoposte a sbalzi termici equivalenti. L'elettrodo viene lasciato giornalmente in immersione per dieci minuti anche nelle petri segnate come controlli, senza avviare la stimolazione al fine di sottoporre ciascun gruppo di cellule alle medesime condizioni. Infatti l'unico parametro che differenzia le petri “stimolate” dalle petri “controllo” è il fatto che le prime sono messe a contatto con un campo elettrico, mentre le seconde no. Cioè si cerca di evitare che la presenza di un corpo estraneo, l'elettrodo, essendo a diretto contatto con il terreno di coltura, disturbi la riproduzione delle cellule, al di là della sola applicazione del campo elettrico.

All'inizio e alla fine di ogni analisi le cellule vengono fotografate tramite fotocamera CCD applicata ad un microscopio Nikon Eclipse 80i in campo chiaro, che fornisce

un ingrandimento di 40x: su tali foto è stato poi effettuato il conteggio delle cellule presenti. Per rendere il confronto tra le petri il più attendibile possibile, si identificano dieci zone casualmente scelte uguali per tutti e due i tipi di petri di ogni coppia, la “stimolata” e il “controllo”, e si siglano sul fondo della stessa petri all'inizio della settimana, in modo da poter monitorare sempre lo stesso campo.

Per ogni test sono quindi necessari:

- petri dal diametro di 35 mm ciascuna, contenenti astrociti murini e terreno di coltura;
- dispositivo Rexon-age con opportuni elettrodi;
- cappa sterilizzata;
- incubatore;
- microscopio ottico.

Protocollo sperimentale:

- a) allestimento di petri contenenti gli astrociti murini da analizzare ed il rispettivo terreno di coltura, suddivise in coppie “stimolata/controllo”;
- b) indicazione su ogni petri dei dieci campioni scelti;
- c) monitoraggio delle cellule prima della stimolazione nelle dieci zone campione;
- d) stimolazione giornaliera della petri indicate come “stimolate” con il dispositivo Rexon-age regolato a 40 per una durata di dieci minuti, per quattro giorni consecutivi;
- e) immersione giornaliera dell'elettrodo nelle petri indicate come “controlli”, dieci minuti ciascuna per ogni giorno di stimolazione;
- f) al terzo giorno, di solito, il terreno viene rinfrescato;
- g) monitoraggio delle cellule nelle dieci zone campione dopo la stimolazione.

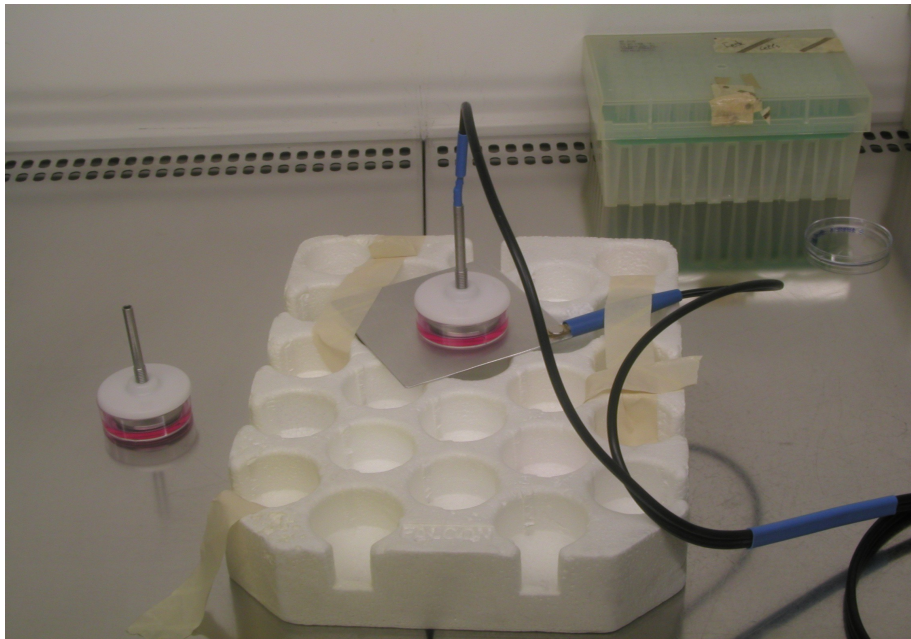


Immagine 10: Coppia stimolata/controllo durante la stimolazione

4.4 Elaborazione dei dati

Le foto che sono state scattate, come detto precedentemente, servono per contare le cellule presenti in ogni campo delle petri. Infatti l'elaborazione dati riguardante gli astrociti murini consiste nel calcolo del tasso di crescita, con lo scopo di evidenziare eventuali differenze tra le cellule stimolate e quelle di controllo.

Le immagini rilevate con il microscopio sono state migliorate tramite un filtro, in particolare aumentandone il contrasto per rendere più visibili i nuclei delle cellule tramite il programma *ImageJ*. Le due immagini seguenti mostrano come una foto originale è perfezionata se viene corretta con tale programma.

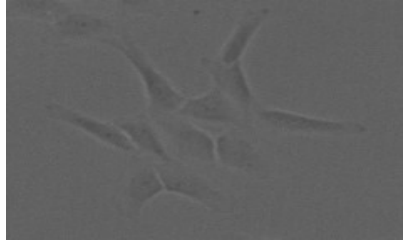


Immagine 11: Foto originale

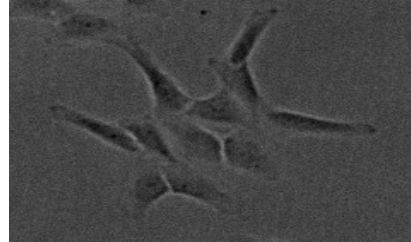


Immagine 12: Foto perfezionata con ImageJ

Per valutare l'andamento della crescita delle cellule in ogni settimana, sono stati calcolati i tassi di crescita, secondo la formula:

$$T = \frac{N_f - N_i}{N_i}$$

dove N_f indica il numero di cellule presenti dopo il periodo di trattamento ed N_i il numero di cellule presenti prima dell'inizio del trattamento.

Altro parametro utilizzato è la SEM (Standard error of the mean, o errore standard), per la quale, invece, è stata utilizzata la seguente formula:

$$SEM = \frac{\sqrt{\frac{\sum_1^n (x_m - x_i)^2}{n}}}{\sqrt{n}}$$

che permette di valutare la variabilità statistica dei risultati, ovvero la precisione dei dati acquisiti. Si utilizza l'errore standard invece della deviazione standard, in quanto dà una stima della variabilità del tasso di crescita.

5

Risultati

5.1 Risultati dei test svolti

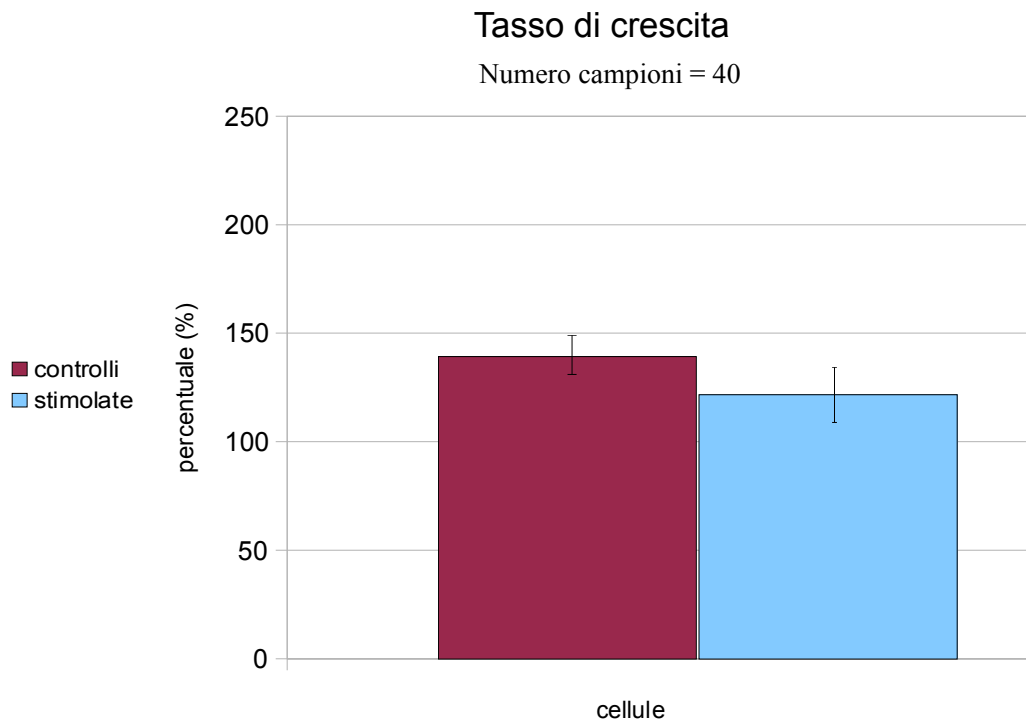
Vengono confrontati i valori del tasso di crescita per ciascuna coppia di petri, ovvero la petri trattata e il controllo non trattato, al fine di monitorare un eventuale effetto del trattamento.

Di seguito verranno mostrati gli istogrammi dei valori del tasso di crescita delle cellule trattate e di quelle di controllo.

Per tutti i test la durata della stimolazione è di quattro giorni consecutivi ad una potenza 40 (pari a potenza efficace di circa 2 W).

Inoltre si considera il valore della SEM per decidere il grado di incertezza della stimolazione.

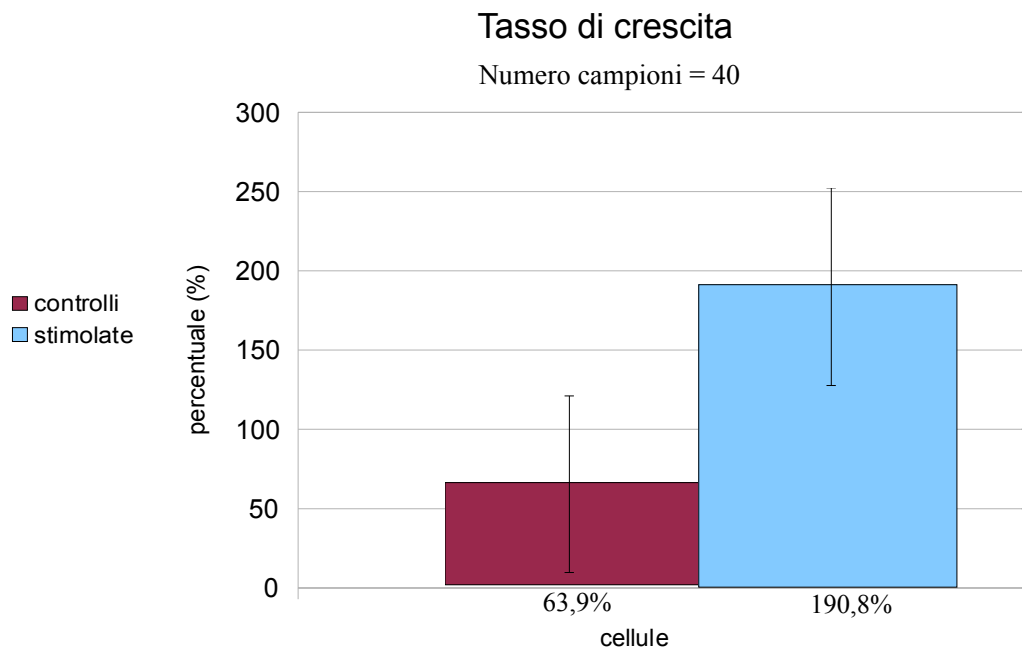
Test 1



Le cellule delle petri controlli sono aumentate del 142,5% mentre le cellule delle petri stimulate sono aumentate del 124,8%. Si nota quindi una differenza di tasso di crescita tra i due gruppi, la cui differenza è del 17,7%. In questo caso le cellule delle petri controlli sono cresciute di più di quelle stimulate, ma solo di una piccola percentuale.

L'errore standard per i controlli (747,5%) è simile a quello delle stimulate (777%), ed è un valore alto, il che associa alla stima un'incertezza abbastanza elevata. Cioè la SEM dimostra come i due gruppi non siano statisticamente significativi.

Test 2

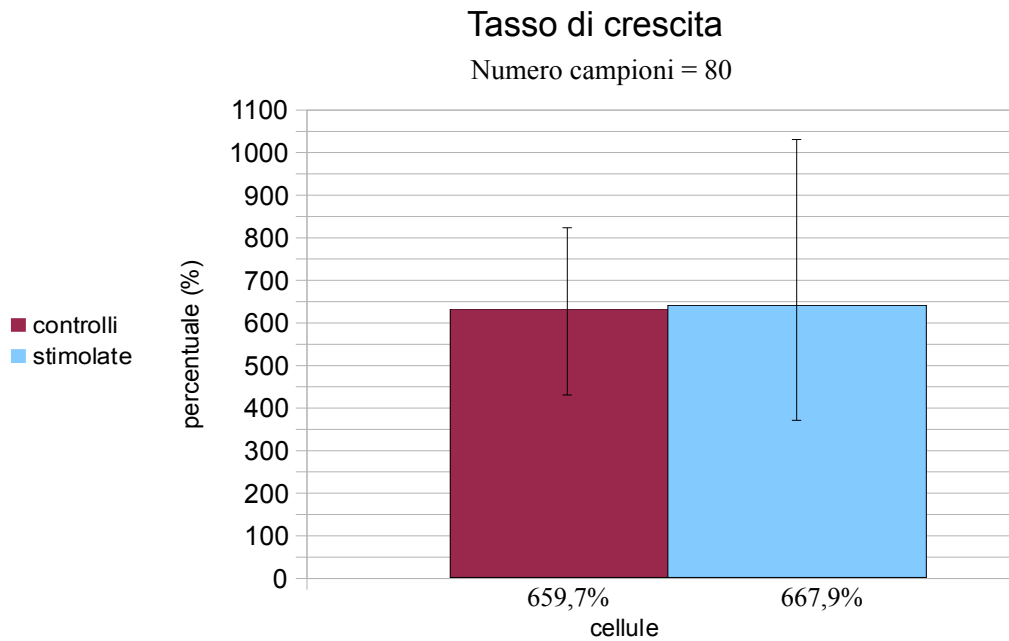


Nel secondo test le cellule delle petri controlli sono aumentate del 63,9% mentre le cellule delle petri stimolate sono aumentate del 190,8%. La differenza di tasso di crescita tra i due gruppi è aumentata, è del 126,9%. In questo caso, però, sono le cellule delle petri stimolate ad aumentare, e aumentano molto di più di quelle dei controlli.

L'errore standard per le stimolate (36702%) è maggiore rispetto a quello dei controlli (30853%), e, come nel caso precedente, associa alla stima un'incertezza abbastanza elevata.

Quindi i tassi di crescita delle cellule trattate e dei controlli, nonostante siano visibilmente diversi, come nel test precedente non risultano staticamente significativi.

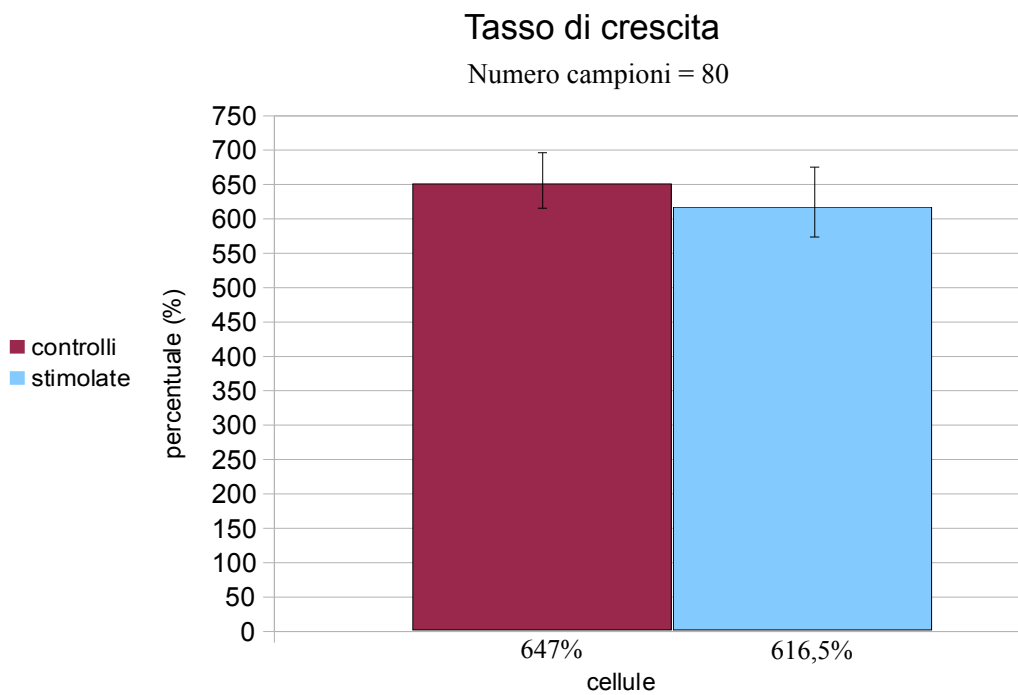
Test 3



Anche nel terzo test le cellule delle petri stimolate crescono di più delle cellule delle petri controlli, infatti le prime aumentano del 667,9% mentre le seconde del 659,7%. Qui la differenza di tasso di crescita tra i due gruppi, che è dell' 8.2%, è diminuita notevolmente ed è proprio minima.

Anche qui l'errore standard per i controlli (30853%) è simile a quello delle stimolate (36702%), ed è un valore alto.

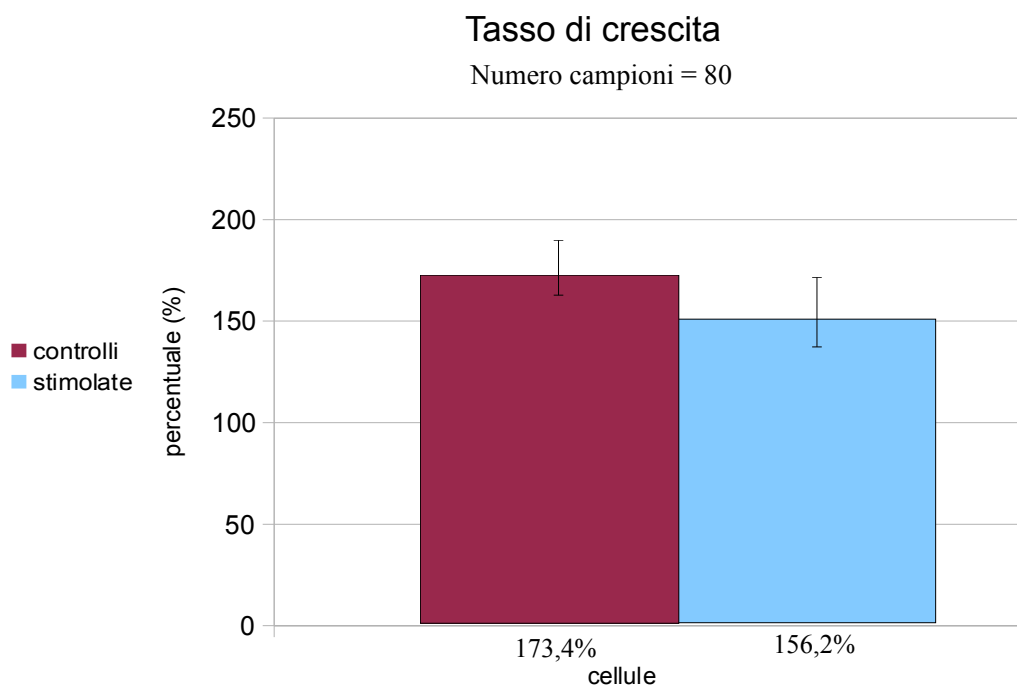
Test 4



Nel quarto test si verifica una situazione simile al primo test, cioè le cellule delle petri controlli, che crescono del 647%, crescono di più di quelle delle cellule delle petri stimulate, che crescono del 616,5%. Però, rispetto al primo test, la differenza di tasso di crescita tra i due gruppi è aumentata, arrivando ad essere del 30,5%.

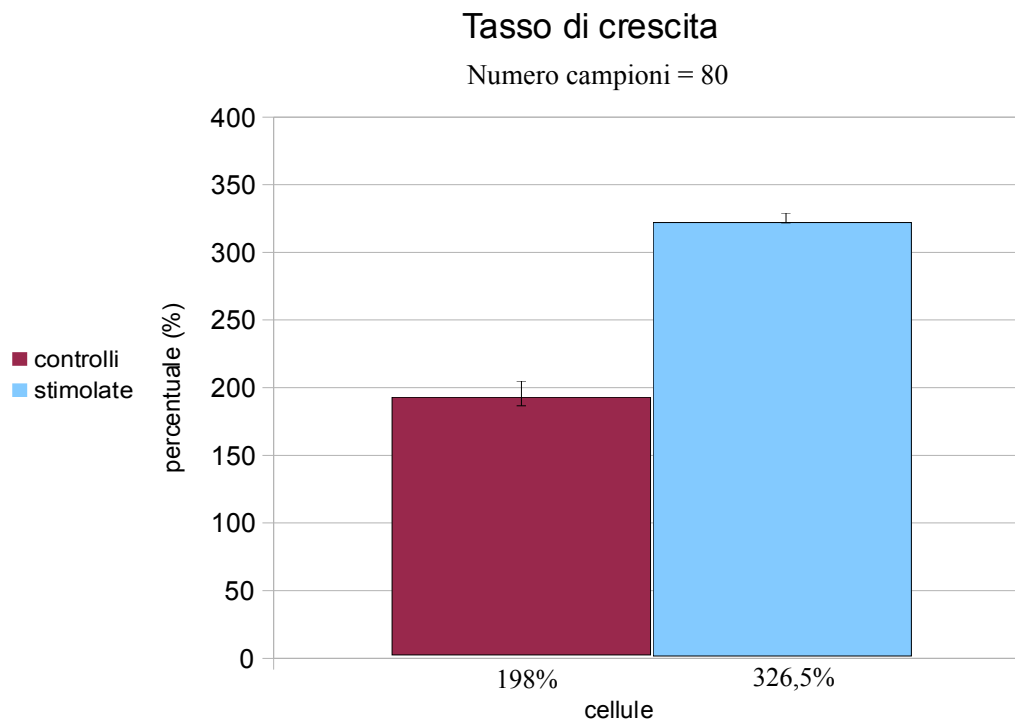
Anche l'errore standard per i controlli (2489,4%) è maggiore di quello delle stimulate (2392%), restando però un valore simile.

Test 5



Anche nel quinto test per quanto riguarda il tasso di crescita si verifica una situazione simile al primo test, infatti, le cellule delle petri controlli, che crescono del 173,4%, crescono di più di quelle delle cellule delle petri stimulate, che crescono del 156,2%. A differenza del caso precedente però, anche la differenza di tasso di crescita e l'errore standard assumono lo stesso andamento: infatti la differenza di tasso di crescita tra i due gruppi è simile, anzi è quasi uguale, essendo del 17,2%, e l'errore standard per i controlli (112,6%) è maggiore di quello delle stimulate (87,3%).

Test 6



Nel sesto test si verifica una situazione simile al secondo test, cioè le cellule delle petri stimulate crescono di più di quelle delle cellule delle petri controlli, in particolare le prime crescono del 326,5% mentre le seconde del 198%. Anche la differenza tra i due tassi di crescita, che è del 128,5% è simile, ed è molto elevata. L'errore standard invece, sia per le stimulate (174%) che per i controlli (107,1%), è diminuito di molto, pur restando maggiore nelle stimulate.

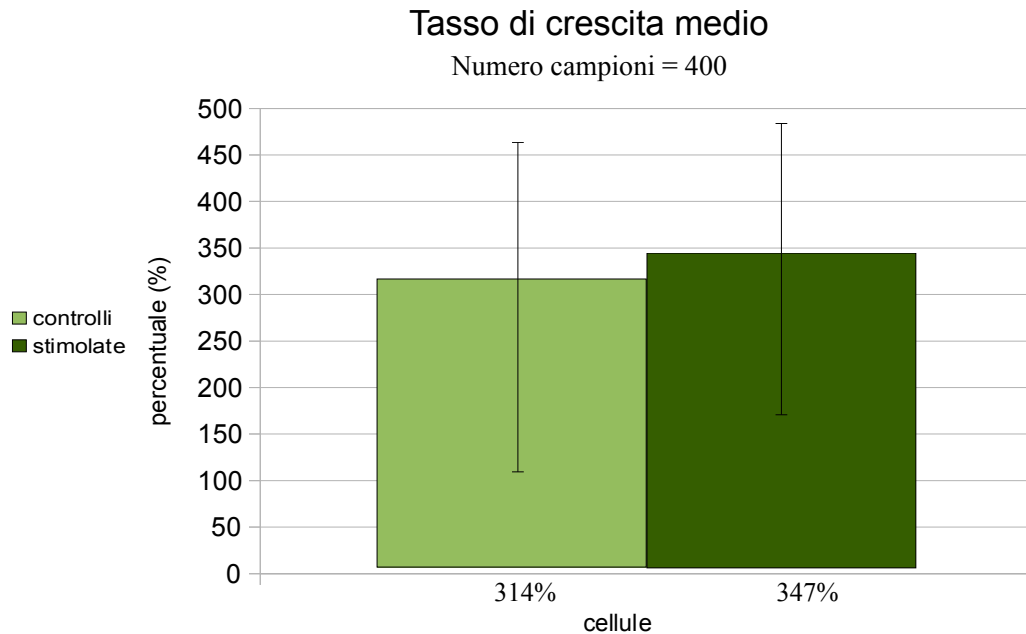
6

Conclusioni e commenti

Dai risultati ottenuti con i test volti a valutare l'effetto del Rexion-age sulla proliferazione cellulare, si osserva che, nonostante l'aumento del tasso di crescita sia un fattore che si presenta spesso in tutte le sperimentazioni svolte, la variabilità statistica è tendenzialmente abbastanza elevata. Si ha una variabilità di questo tipo perchè bisogna ricordare che l'analisi effettuata riguarda un sistema biologico, in particolare colture primarie, che è quindi influenzato da numerosi fattori non direttamente controllabili.

Inoltre bisogna valutare anche il fatto che il numero di campioni considerato non è sufficientemente elevato.

E' per questo motivo che si passa ad analizzare i dati considerando il tasso di crescita medio delle cellule stimolate e delle cellule utilizzate come controlli.



Dai dati risulta un incremento più significativo nel tasso di crescita medio delle cellule stimolate, che è del 347%, rispetto al tasso di crescita delle cellule non trattate, che è del 314%; con una differenza del 33%.

L'errore standard delle cellule stimolate (1196,3%) risulta minore rispetto a quello delle cellule non trattate (1333,4%), ma si tratta comunque di due valori alti.

Usando come dati i tassi di crescita medi delle cellule stimolate e dei controlli si mantiene il fattore di elevata sensibilità del sistema biologico esaminato, ed è quindi plausibile che i tassi di crescita possano essere molto diversi tra loro influenzando l'errore standard, ma invece aumenta notevolmente il numero di campioni analizzato. Per questo il risultato ottenuto può essere ritenuto più preciso.

Quindi in questi primi esperimenti su colture primarie di astrociti di ratto sembra esserci una lieve correlazione tra trattamento e aumento del tasso di crescita. Quest'esito è un "indizio" per continuare l'analisi.

Prospettive future

I test svolti fino ad oggi sono solo una parte della sperimentazione che ha il fine di valutare l'azione del Raxon-age su cellule gliali sane, cercando l'eventuale legame tra incremento del tasso di proliferazione di tali cellule e loro esposizione a campi elettromagnetici variabili secondo i parametri determinati in base alla teoria della risonanza quantica molecolare.

I risultati positivi ottenuti a basse frequenze e con un numero ridotto di cellule inducono a ripetere l'analisi a potenze più elevate, aumentando la numerosità del campione e con periodi di terapia più lunghi.

Bibliografia

- [1] F. W. Pfrieger, *Role of glia in synapse development*, 2002.
- [2] *Classificazione Internazionale delle malattie per l'Oncologia*. Terza edizione copyright 2000, WHO.
- [3] Harrison, *Principi di medicina interna*, el sevier ed.
- [4] Robbins and Cotran, *Le basi patologiche delle malattie*, mcgrow hill ed.
- [5] W.R.Adey, “*Biological effects of electromagnetic fields*”, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 51, pp. 410-416, 1993.
- [6] M. R. Scarfi, *Effetti biologici dei campi elettromagnetici nella sperimentazione in vitro*.
- [7] S.K.Dutta, A.Subramoniam, B.Ghosh, and R.Parshad, “Microwave radiation-induced calcium ion efflux from human neuroblastoma cells in culture,” *Bioelectromagnetics*, vol. 5, pp. 71–78, 1984.
- [8] T.A.Litovitz, D.Krause, M.Panafiel, E.C.Elson, and J.M.Mullins, *The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine the carboxylase activity*, 1993.
- [9] P.W.French, M.Donnelland, and D.R.McKenzie, “Electromagnetic radiation at 835mhz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line,” *Bioelectrochem and Bioenerg.*, vol.

43, pp. 13–18, 1997.

- [10] E.D.Kirson, Z.Gurvich, R.Schneiderman, E.Dekel, A.Itzhaki, Y.Wasserman, R.Schatzberger, and Y.Palti, *Disruption of cancer cell replication by alternative electric fields*, 2004.
- [11] P. L. Corti and I. G. Pozzato, *Risonanza Quantica Molecolare e le sue applicazioni cliniche*.
- [12] P. C. Reggiani, *Comments on Vesalius and Rexonage, two applications of high frequency electrical fields, and preliminary experimental results*, 2007.
- [13] “Sito dell’azienda: www.vesalius.it”.
- [14] “Sito dell’azienda: www.rexon-age.it”.